一株海洋微藻的鉴定及其原生质体制备条件优化

丁涓[1] 张莉[1] 郝宇晨[2] 叶城[2] 蒲洋[2*]

(鲁东大学生命科学学院，山东省　烟台　264000；2.鲁东大学农学院，山东省　烟台　264000)

摘要：从烟台海滨水域分离出一株海洋单细胞微藻。通过形态学鉴定和 18S rDNA 基因序列分析确定该株真核微藻属于四爿藻属（*Tetraselmis* sp.），命名为 138 号藻种。利用 Central Composite 法的 Box-Behnken 实验设计优化了此藻株的原生质体备条件。获得了以原生质体制备率为目标函数的三元二次回归方程：

$Y_1=88.30-0.19X_1+2.44X_2+2.28X_3-0.95X_1X_2-3.13X_1X_3+3.78X_2X_3-9.85X_1^2-7.95X_2^2-7.22X_3^2$。得到最优制备条件：混合酶比例纤维素酶：果胶酶为 5:2；混合酶浓度为 4.5%（纤维素酶浓度为 2.7%，果胶酶浓度为 1.8%），；缓冲液 pH 为 6.4，最高理论制备率 81.5%。经过 3 次平行试验，实际得到的原生质体制备率为 80.5%，与模型预测值的误差为 1.24%。绿色荧光蛋白报告基因瞬时表达检测了所制备原生质体的转化能力。

关键词：分子鉴定; 原生质体制备; 响应面优化

Identification of a marine microalgae and optimization of protoplast preparation

DING Juan[1], ZHANG Li[1], HAO Yu Cheng[2], YE Cheng[2], PU Yang[2*]

(1. School of Life Sciences Ludong University, YanTai, 264000, Shan Dong;

2. School of Agriculture Ludong University, YanTai, 264000, Shan Dong)

Abstract: A unicellular marine microalgae was isolated at the seaside of Yantai. Both morphological identification and sequence analysis of 18S rDNA showed that this eukaryotic marine microalgae strain is *Tetraselmis* sp., named 138 algae. A Box-Behnken central composite design was utilized as an optimization of protoplast preparation rate within the experimental range. An equation was obtained to fit the empirical evidence of protoplast formation rate (Y).

$Y_1=88.30-0.19X_1+2.44X_2+2.28X_3-0.95X_1X_2-3.13X_1X_3+3.78X_2X_3-9.85X_1^2-7.95X_2^2-7.22X_3^2$. The optimum conditions of protoplasts formation was cellulose: macerozyme at 5:2, concentration of mixed enzymes at 4.5% (2.7% cellulose and 1.8% macerozyme) and buffer pH at 6.4. The theoretical maximum rate is 81.5%. Three parallel verification test proved actual measured rate is 80.5%. The error between model prediction and experimental testing is about 1.24%. Then the transformation efficiency of protoplast was confirmed by the transient expression of GFP gene.

Key words: Molecular identification; Protoplast preparation; Response surface optimization

真核微藻是地球上分布很广的低等原始植物，对其进行鉴定及分类是研究微藻的基础，也是一个难点[1]。传统的微藻鉴定方法多以形态学鉴定为主，但是在微藻个体极小或因环境的影响导致亲缘关系较近的种类形态差异较大的情况下，传统的鉴定方法具有一定的局限[2,3]。随着分子生物学的发展以及基因序列数据库的不断丰富，基于进化上保守的 18S 核糖体基因（18S rDNA）序列，在分子水平上对真核微藻进行鉴定和分类，在方法学以及实验成本上都已经变得非常成熟和实用[4]。

真核微藻适应性强且形态多样，是最基础的初级生产者之一。微藻细胞内富含高价值的蛋白质与代谢产物，广泛地应用于食品、医药、及生物质能源等领域[5,6]。同时其细胞结构简单、易培养、生长速度快、易于进行基因工程操作，也是进行光合作用和代谢机制研究的良好研究对象；因此借助基因工程和细胞工程技术改良藻种，具有广泛的应用前景[6]。

根据报道，已经完成了原生质体制备和分离的真核藻类包括 3 个属的大型绿藻、褐藻（*Laminaria*）、单细胞红藻紫球藻（*Porphyridium*）和江蓠属（*Gracialria*）红藻。之后进行了江蓠属（*Gracialria*）红藻原生质体细胞的融合和再生研究[7-15]。本文分离的四爿藻(*Chlorella* sp.)是一种单细胞海洋绿藻，在基础研究和实际应用方面都有很重要的价值。目前已经有关于其原生质体制备的相关报道；由于海藻细胞壁成分多样性的和复杂性，如何通过混合酶及不同处理条件等多因素的共同作用，进一步提高四爿藻原生质体制备率，还有待深入研究[10,11]。应用 Box-Behnken 设计的响应曲面设计方法（Response Surface Methodology，RSM），能够利用合理的试验设计，同时研究多个参数的组合效应。通过对回归方程的计算和实验验证，优化工艺参数，解决多变量问题 [16-18]。在本文中，将体系的响应（四爿藻原生质体制备率）作为三个因素（纤维素酶和果胶酶混酶的比例、浓度以及酶解时的 pH）的函数，优化其原生质体制备条件，提高了原生质体的制备率，并利用绿色荧光蛋白（GFP）报告基因对所制备的原生质体转化系统进行了检测。本研究将为此单细胞微藻的基因转化和遗传育种研究提供有力的工具；同时为这一藻种的产业化应用奠定了基础。

1、材料与方法

1.1 实验材料与试剂

f/2 海水培养基用于培养 138 号藻种。

磷酸缓冲溶液配制　溶液 A: KH_2PO_4 0.2 mol/L

　　　　　　　　　溶液 B: K_2HPO_4 0.2 mol/L

纤维素酶（Cellulose R-10，Yakult Honsha）、果胶酶（Macerozyme R-10，Yakult Honsha）

预处理剂：50 mmol/L EDTA、25 mmol/L DTT

原生质体转化能力验证：GFP 报告基因质粒 pEGFP-N1（Clontech 公司），质粒中含有能够在真核细胞中表达的 GFP 表达框（CMV pro-EGFP-SV40 ter），中国科学院烟台海岸带研究所生物资源重点实验室惠赠，高浓度质粒已提取并于-20 °C 冻存；直径为 0.425-0.600 mm 玻璃珠用于转化。以灭菌海水为溶剂，配制 0.5M 甘露醇溶液作为渗透剂。[1]

---

[1] [1]鲁东大学科技项目（29350301）；鲁东大学科研启动基金和山西省煤基重点科技攻关项目资助，项目编号分别为 ly2014041，（FT2014-01）
作者介绍：丁涓（1980 年生），女，山东烟台，硕士，实验师，海洋生物资源。
通讯作者：蒲洋（1981 年生），男，河北衡水，博士，讲师，海洋生物资源。

1.2 藻种的分离培养

藻种分离于 2016 年 6 月，取样地点为山东烟台养马岛大桥附近，采集的是表层海水。水样划线接种到 f/2 固体培养基，光照培养箱培养，温度设定为 25 °C，光强设定为 5500 lx，光暗比 12 h:12 h。培养至第 7 天后在固体培养基表面观察到明显的单藻落，挑取并镜检，通过形态鉴定初步判断该藻株为扁藻。

1.3 18S rDNA 的 PCR 扩增

使用 18S rDNA 通用引物：18S-F（CAAGTTTCTGCCCTATCAGCT）和 18S-R（GCTTTC GCAGTAGTTCGTCTT）。PCR 扩增条件：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s，50°C 退火 30 s，72 °C 延伸 45 s，35 个循环；72 °C 延伸 10 min。PCR 产物送上海生工测序。

1.4 序列分析及系统进化树的构建

将测序所得序列，进行 BLAST 相似序列比对[14]。根据比对结果的 E 值、一致性以及 Gaps 的大小，下载最相近的几个序列。使用软件 MEGA7.0 中的邻接法（NJ）构建系统进化树，对其进行分析鉴定。

1.5 原生质体分离纯化

将分离出的 138 号藻种培养至对数期，取藻液 2 mL，4000 r/min 离心 10 min，除去上清液，收集沉淀。加入 2 mL 灭菌水充分洗涤，4000 r/min 离心 10 min，去除上清液，重复 2 次。再将藻细胞悬浮于 5 mL 的预处理剂，30 °C 摇床轻微震荡 60 min，4000 r/min 离心 5 min 去除预处理剂。预处理的藻细胞，加入 2 mL 灭菌水洗涤 2 次。将 0.5 mL 的混合酶液加入不同 pH(5.0、5.5、6.0、6.5、7)缓冲液处理藻细胞，在 150 r/min 的摇床上震荡。每隔 30 min 取适量藻液，显微镜下观察破壁情况并计数，至分离出的原生质体数量不再增加为止。

1.6 原生质体制备率计算

采用低渗爆破法：定量吸取原生质体悬浮液，分别用无菌水和高渗溶液重悬浮，静置 60 min 后用血球计数板计数。

原生质体数=A(悬浮于高渗溶液的细胞数)－C(悬浮于无菌水后破裂的残留细胞数)

原生质体制备率(%) = (A－C/藻液体积)×100%

1.7 单因素实验

1.7.1 两种酶比例的选择

将体积分数为 5%的纤维素酶和果胶酶按照 1:3、2:3、1:1、3:2、4:1 的比例在 0.85 mol/L KCL 溶液中配制成不同浓度的混合酶解液，混合均匀后加入预处理后的藻细胞，调节 pH 为 6，酶解 6 h 后终止反应，测定原生质体制备率。

1.7.2 水解酶浓度的选择

将纤维素酶、果胶酶按照 3:2 的比例按照体积分数分别为 0.50%、0.75%、1.25%、2.50%、5.00%的量在 0.85mol/L KCL 溶液中配制成不同浓度的混合酶解液，震荡混合均匀，加入预处理后的藻细胞，调节 pH 为 6，酶解 6 h 后终止反应，测定原生质体制备率。

1.7.3 最佳 pH 的选择

将纤维素酶、果胶酶以 3:2 的比例按照 2.50%的体积分数在 0.85 mol/L KCL 溶液中配制成不同浓度的混合酶解液，震荡使其混合均匀，加入到预处理后的藻细胞中，调节 pH 分别为 5.5、6、6.5、7、7.5，酶解 6 h 后终止反应，测定原生质体制备率。

1.8 响应面实验设计

采用 Box-Behnken 中心组合设计以 X_1（酶比）、X_2（酶浓度）、X_3（pH）为自变量，以 Y_1（原生质体制备率%）为响应值的三因素三水平实验，中心组合试验方案中的因素及水平如表 1 所示。使用 Design-Expert 8.0 进行数据分析。分别选择各个因素中以最高制备率为中间值的 3 个水平，即酶比例为 1:1、3:2 和 4:1，两种酶浓度为 1.25%、2.50%和 5.0%，pH 为 6.0、6.5 和 7.0，设计了 3 因素三水平的响应面实验，中心试验重复 5 次，共进行了 17 个试验。

表 1 响应面实验因素与水平

Table 1 Factors and levels used in response surface experiments

变量	-1	0	1
酶比例	1:1	3:2	4:1
酶浓度	1.25%	2.5%	5%
pH	6.0	6.5	7.0

1.9 GFP 瞬时表达验证

1000 r/min 离心 10 s 收集最优条件下制备的原生质体细胞，去上清后用上述的海水甘露醇溶液洗涤藻体两次，再用 500 μL 此甘露醇溶液重悬，藻细胞计数约为 2.0×10^7 个。再向重悬的原生质体中加入 2 μg 加质粒，再加入 400 mg 玻璃珠，涡旋处理 25 s。用适量甘露醇溶液洗出原生质体细胞，25℃黑暗培养 10 h。离心收集藻体，于 f/2 海水培养液中继续培养 72 h 后，收集大约 4.0×10^5 个原生质体样品，通过荧光显微镜（Nikon，Eclipse 50i），以蓝光激发观察转化结果。

2 结果及分析

2.1 藻株形态学特征

光学显微镜下观察如图 1 所示。在光学显微镜下，藻体呈现明显的单细胞体，绿色，长圆形或瓜子形，一般扁压，左右基本对称，腹部较平整，而背部略微突出。细胞底部呈椭圆形，前端中央有 1 个明显的凹陷并伸出鞭毛。

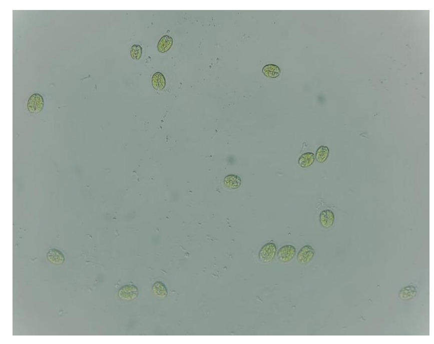


图 1 138 号藻株形态

Figure 1 The morphology of 138

2.2 分子生物学鉴定结果

2.2.1 样品总 DNA 及 PCR 扩增产物电泳检测

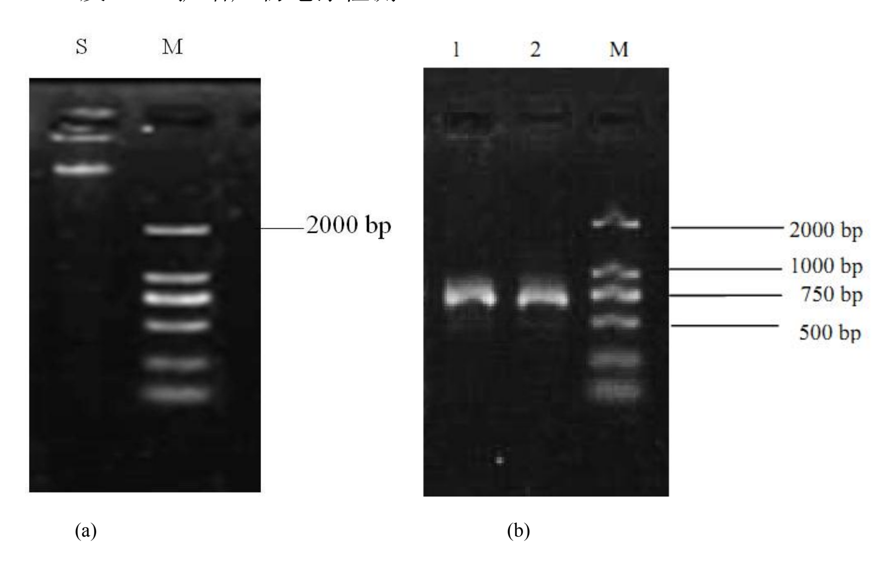


图 2 样品总 DNA 电泳图（a）和 PCR 扩增产物电泳图（b）

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of total DNA (a) and PCR (b)

注：S 为 138 号藻株样品总 DNA；1、2 为 138 号藻株样品 PCR 扩增产物；M 为 DL 2000 DNA Marker

样品的总 DNA 电泳检测结果如图 2a 所示，由图中的条带可知提取的 DNA 纯度较高，能够进行下一步的 PCR 扩增。PCR 产物 2%琼脂糖凝胶电泳图谱显示仅有一条清晰的条带，表明 PCR 结果良好，且产物在 500 bp 至 750 bp 间，接近 700 bp。

2.2.2 18S rDNA 序列分析比对及进化树构建

PCR 扩增产物经纯化后测序，测序结果如图 3：测得 138 号藻种的 18S rDNA 的长度为 627 bp。

```
    5’ -TGAGTTCGTCTTTCATAAATCCAAGAATTTCACCTCTGACAAT
GAAATACGAATGTCCCCGACTGTCCCTCTTAATCATTACTCTGGTCTCACA
GACCAACAAGATAAGCCAGAGTCCTATCATGTTATTCCATGCTAATGTATT
CAGAGCGATGGCTTGCTTTGAACACTCTAATTTACTCAAAGTAACCTCGTC
AGCTCCTAGTCCCGGACAGTTAAGCCCAGGAGCTAGTCCCCGACAACAAGA
TGGGACTGGCCAGTGCACATCGAAACGACGGACCGGCAAATCCCATCCGAA
ATCCAACTACGAGCTTTTTAACTGCAGCAACTTAAATATACGCTATTGGAG
CTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAATGGATCCTCG
TTAAGGTTGTTTAGATTGTACTCATTCCAATTACCAGACTTGAAAAGCCCG
GTATTGTTATTTATTGTCACTACCTCCCTGTGTCAGGATTGGGTAATTTGC
GCGCCTGCTGCCTTCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCC
GGAATCGAACCCTAATTCCCCGTCACCCGTTACCACCATGGTAGGCCTCTA
TCCTACCATCGCCAGCTGATAGG-3’
```

图 3 138 号藻株 18S rDNA 基因测序结果

Figure 3 Sequence of 18S rDNA gene of 138

18S rDNA 序列用 BLAST 进行同源性比对，此藻种与九种不同四爿藻的 18S rDNA 在 Query cover 值和 Ident 值相似度达到 99%，结果表明检测藻种应为四爿藻属（*Tetraselmis*）。选取相似度最高的这九种四爿藻，下载其全部 18S rDNA 序列，与 138 号藻种序列构建的进化树见图 4。

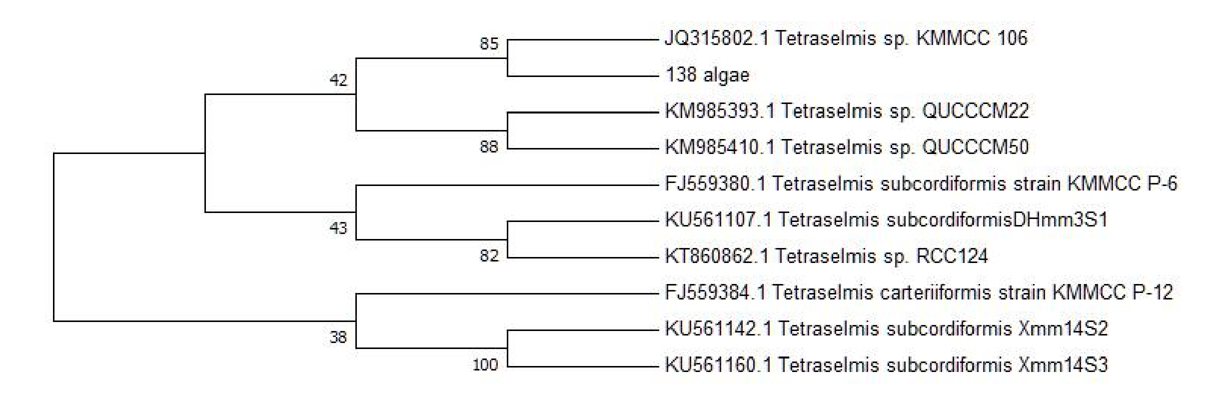


图 4 基于 18S rDNA 序列构建的系统发生树

Figure 4 Phylogenetic tree based on 18S rDNA

从图 4 中可以看出，在 NJ 法构建的进化树上，138 号藻株与 *Tetraselmis* sp. KMMCC 106 聚成一支，自展值为 85%，置信度在显著水平，可以认定 138 号藻株与 *Tetraselmis* sp. KMMCC 106 属于同一属藻类。所以 138 号藻株属于绿藻门（Chlorophyta），绿枝藻纲（Prasinophyceae），四爿藻属（*Tetraselmis*）[6,19]。

2.3 不同酶解时间形态比较

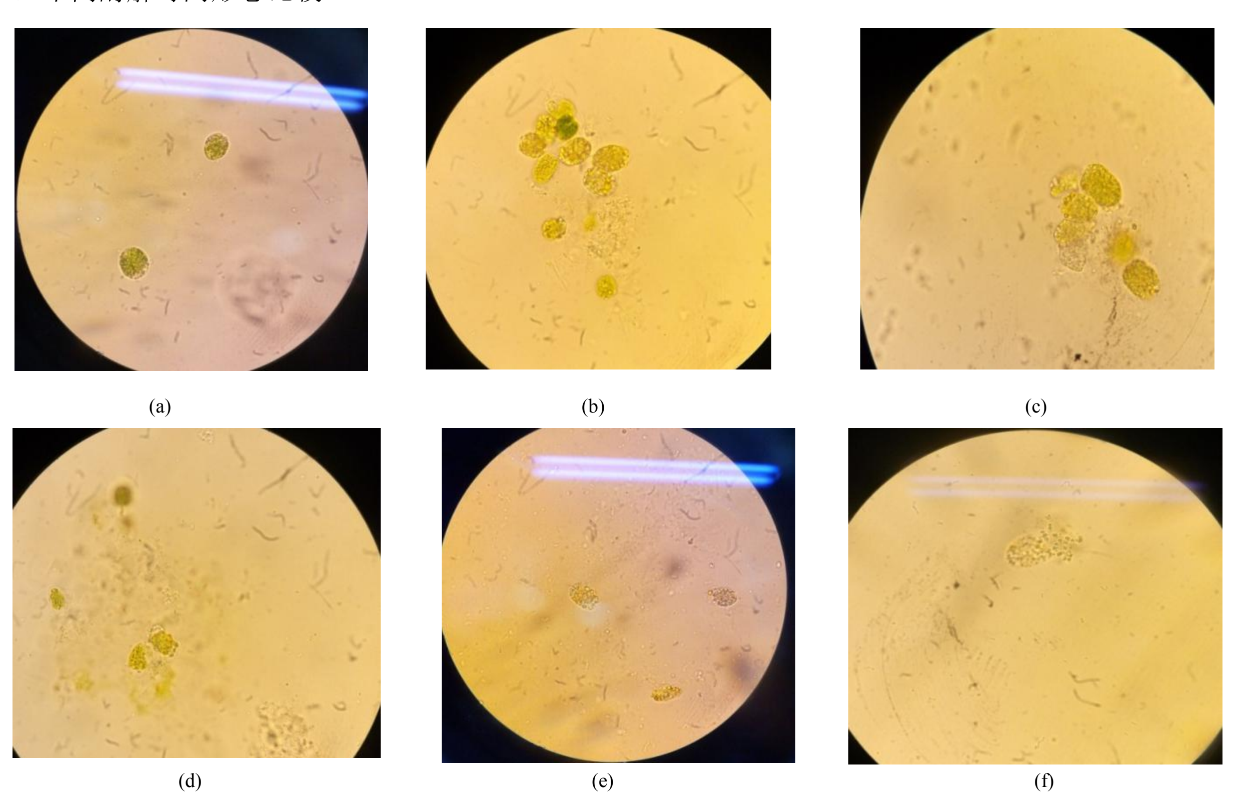


图 5 138 号藻体不同酶解时间下的形态变化(10×100)

Figure 5 The protoplast morphology of 138 under different enzymatic hydrolysis treats (10×100)

注：(a)未处理的藻体；(b)酶解 8 h 的藻体；(c)酶解 10 h 的藻体；(d)酶解 30 h 的藻体；(e)高渗溶液下的藻体；(f)低渗溶液下的藻体

如图 5 所示藻体酶解 8 h 后开始破壁；10 h 后能够清晰地观察到藻体的破壁现象；30 h 后细胞形态与未处理时近似圆形的细胞比较，酶解后藻体细胞呈现不规则现象，油镜下能清晰地观察到藻体细胞周围无细胞壁。

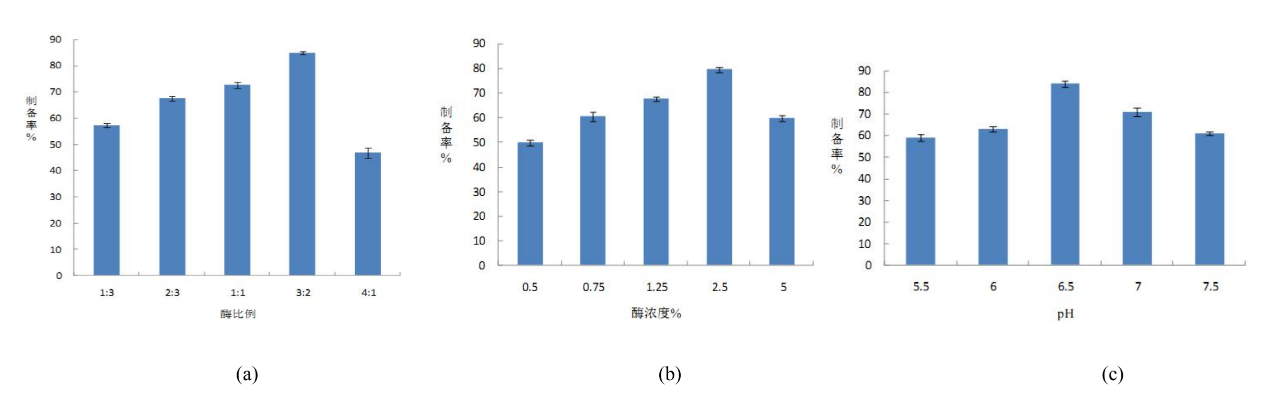
2.4 原生质体鉴定

（1）形态上：细胞壁被酶解后去，裸露的原生质体失去了保护屏障，在形态上比未处理过的藻细胞更接近球形，如图 5a、图 5c、图 5d 所示。随着酶解时间延长，原生质体的形态变得更加不规则（图 5d 酶解 30 h 对比图 5c 酶解 10 h）。在高渗溶液下存在原生质体（图 5(e)）；而低渗溶液下能清晰地观察到原生质体破裂现象（图 5(f)）。

（2）细胞大小：在 100 倍物镜下，藻体近似圆形或者椭圆形，其圆形直径约为 13.75 μm，椭圆形藻体细胞长直径约为 17 μm，短直径约为 11.83 μm，同样酶解 30 h 后的到的原生质体形状不规则近似长方形，长边约为 10 μm，短边约为 0.75 μm。

2.5 原生质体制备单因素实验

不同酶比下原生质体制备率结果见图 6(a)，维素酶果胶酶比例最优为 3:2。后续实验采用此最优酶比例，进行单因素实验结果见图 6(b)，确定最优的酶浓度为 2.50%（纤维素酶浓度为 1.5%，果胶酶浓度为 1.0%）。然后在上述条件下进行不同 pH 的单因素实验（图 6(c)）最终确定了 pH 为 6.5 的最大值。根据单因素实验结果，进行后续的响应面实



(a) (b) (c)

图 6 不同酶比例(a)，不同酶浓度(b)，不同 pH (c)条件下原生质体制备率

Figure 6 The protoplast rate with different enzyme ratios (a), different concentrations of enzyme (b) and different pH (c)

2.6 优化回归模型的创建及显著性检验

根据表 1 及单因素实验确定的三个独立输入变量和输出变量实验结果的不同组合见表 2。

表 2 三因素独立变量的 Box-Behnken 实验设计

Table 2 Box-Behnken experimental design with three independent variable

Run No.	X_1	X_2	X_3	Y_1(%)
1	-1	-1	0	69.4
2	-1	1	0	69.7
3	1	-1	0	73.2
4	1	1	0	70.1
5	0	-1	-1	68.3
6	0	-1	1	66.6
7	0	1	-1	72.1
8	0	1	1	85.5
9	-1	0	-1	67.8

10	1	0	-1	71.4
11	-1	0	1	77.3
12	1	0	1	68.4
13	0	0	0	86.3
14	0	0	0	90.1
15	0	0	0	92.4
16	0	0	0	88.4
17	0	0	0	84.3

经过 Design Expert 软件对实验数据进行多元回归拟合，获得以四爿藻原生质体获得率为目标函数的二次回归方程：

$Y_1=88.30-0.19X_1+2.44X_2+2.28X_3-0.95X_1X_2-3.13X_1X_3+3.78X_2X_3-9.85X_1^2-7.95X_2^2-7.22X_3^2$ 对模型进行回归分析结论见表 3。模型的 F=6.70，效果明显，说明该模型显著；模拟失拟项 F=3.25，$P=0.1425>0.05$，证明失拟项不显著[18]，；$R^2=0.8960$ 线性关系明显，模式调整确定系数 $R^2_{AdJ}=0.7623$，证实该模型能阐述 76.23%相应值得变化，总体证实响应面效果对实验吻合情况较好，实验误差小。从方差分析结果还可以得出：X_1^2，X_2^2，X_3^2 的 $P<0.05$ 差异显著性，各因素的 F 值大小顺序是 $FX_2>FX_3>FX_1$，证明酶浓度和缓冲液 pH 对藻体原生质体的影响效应显著，而酶比例的影响相对较小。

表 3 138 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance regression model of 138

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
模型	1185.95	9	131.77	6.70	0.0101	significant
X_1 酶比	0.28	1	0.28	0.014	0.9082	
X_2 浓度	47.53	1	47.53	2.42	0.1640	
X_3 pH	41.41	1	41.41	2.11	0.1900	
X_1X_2	3.61	1	3.61	0.18	0.6812	
X_1X_3	39.06	1	39.06	1.99	0.2015	
X_2X_3	57.00	1	57.00	2.90	0.1324	
X_1^2	408.52	1	408.52	20.78	0.0026	
X_2^2	266.12	1	266.12	13.53	0.0079	
X_3^2	219.79	1	219.79	11.18	0.0124	
残差	137.64	7	19.66			
失拟项	97.58	3	32.53	3.25	0.1425	not significant
净误差	40.06	4	10.02			
总离差	1323.59	16				

注：$R^2=0.8960$; $R^2_{MJ}=0.7623$

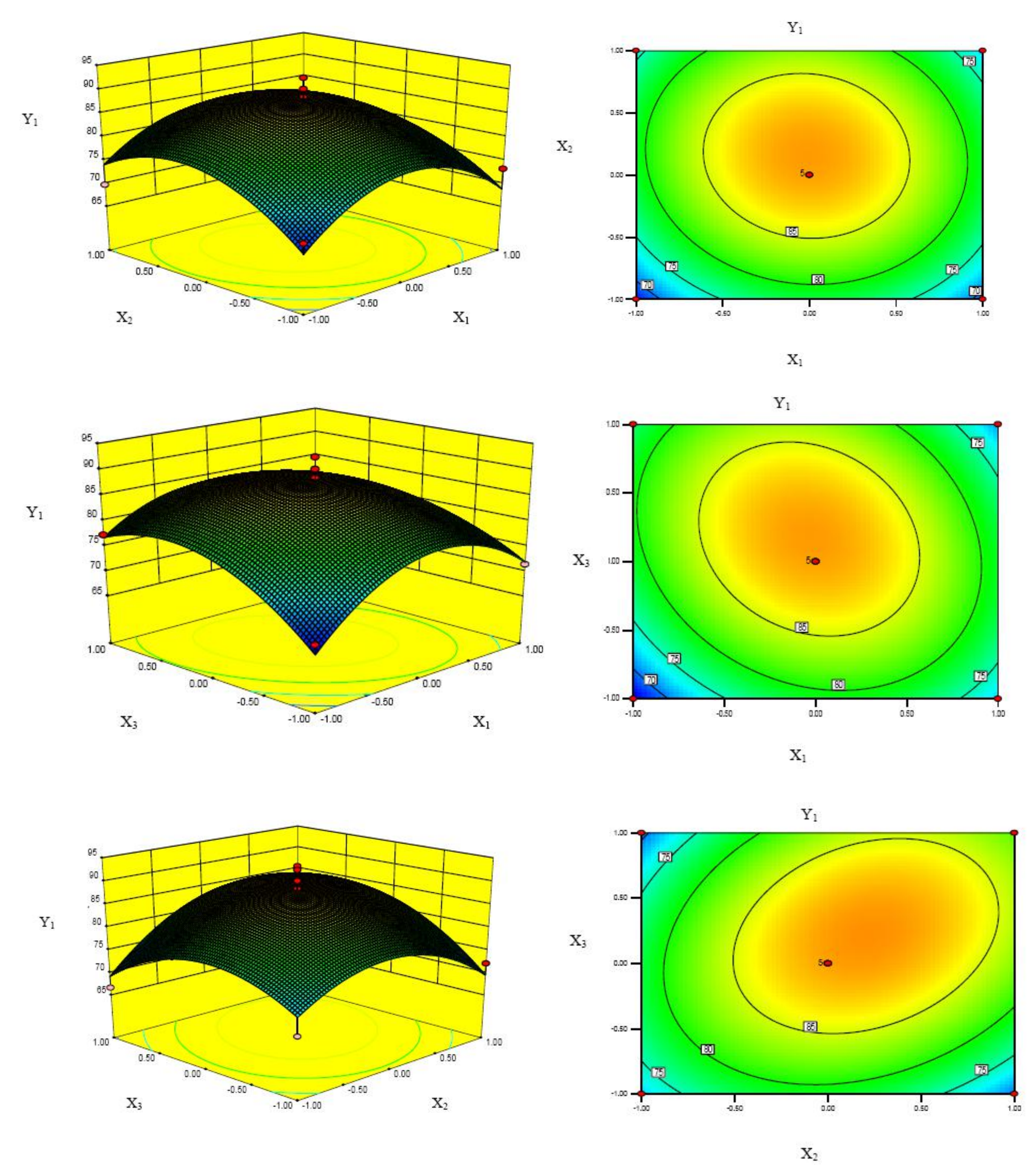


图 7 138 藻株原生质体制备率响应面图

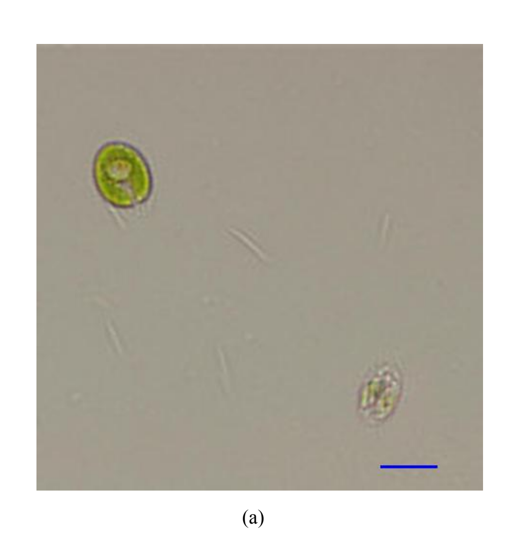
Figure 7 protoplast preparation rate of 138 response surface map

图 7 中曲面的陡峭程度可以表明变量对原生质体制备率的影响程度，曲面较陡表明影响较大，反之则较小；而等高线图反映了因素间交互作用的强弱大小，椭圆形表示交互作用显著，圆形表示交互作用不显著。由图 7 可知：任何 2 个交互因素的响应面都存在最高点，混合酶比例和混合酶浓度的交互作用、混合酶浓度和缓冲液 pH 的交互作用、缓冲液 pH 和混合酶比例的交互作用原生质体制备率的影响极显著（等高线图为椭圆形）。由三维立体图可以看出，两两因素之间的影响均呈基本抛物线型，说明有一个最大值。

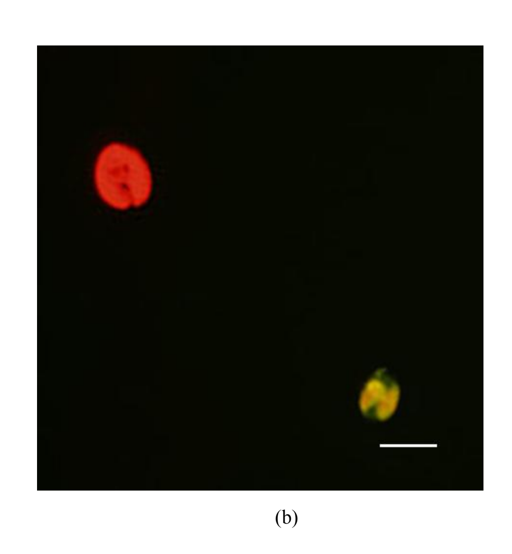
根据方程拟合出四爿藻原生质体制备的最佳条件理论值是：酶比例纤维素酶：果胶酶为 5:2，酶浓度为 4.50%（纤维素酶浓度为 2.7%，果胶酶浓度为 1.8%），缓冲液 pH 为 6.4，理论最高提取率 81.5%。按照此条件经过 3 次平行试验验证，实际求得的原生质体获得率为 80.5%，与模型预测值的误差为 1.24%。

2.7 GFP 瞬时表达验证

使用荧光显微镜观察，白光视野下和蓝光激发后的结果分别如图 8(a)，(b)所示：通过蓝光激发，观察到发出红色荧光的藻体，这是由叶绿素在未转化细胞中产生的；而成功表达了 GFP 的阳性转化子，则发出由 GFP 的绿色荧光与叶绿素的红色荧光叠加而成的黄绿色荧光[6]。根据阳性转化子的比率，计算转化率约为 0.6×10^{-5}。GFP 瞬时表达实验表明通过条件优化后制备得到的 138 号藻的原生质体能够以较高的转化率进行后续所需要的转化操作。



(a)



(b)

图 8 绿色荧光蛋白瞬时表达

Figure 8 GFP transient expression

注：(a)白光下转化后的藻体；(b)蓝光激发下转化后的藻体；标尺为 10 μm

3 讨论

从烟台养马岛大桥附近分离得到 138 号藻株，通过对藻体细胞的显微结构观察和 18S rDNA 序列的分子生物学分析，鉴定出此藻株属于四爿藻属（*Tetraselmis*）。藻体细胞的显微结构与四爿藻极为相似；18S rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行比对，与九株四爿藻属的微藻相似度达到了 99%。由 NJ 法构建的进化树中，138 号藻株与四爿藻属聚成一支，自展值为 85%，置信度在显著水平，可以认定 138 号藻株与四爿藻属微藻为同一个属。因为海藻细胞壁多糖组成的复杂性和多变性，应用于高等植物的相对成熟的的原生质体制备方法不能直接适用，需要根据不同藻种甚至不同生长环境通过复合酶解的方式进行；同时还要考虑混合酶处理时，多种重要因素所造成的影响。为了高效制备 138 号藻的原生质体，以单因素试验确定的原生质体制备的最适条件为基础进行响应面多因素优化试验。最后响应面优化试验得到的 138 号藻原生质体制备的最优条件为：纤维素酶：果胶酶为 5:2；混合酶浓度为 4.50%（纤维素酶浓度为 2.7%，果胶酶浓度为 1.8%），缓冲液 pH 为 6.4，理论最高

制备率为 81.5%。经过 3 次平行试验验证，实际求得的原生质体制备率为 80.5%，与模型预测值的误差为 1.24%。随后利用绿色荧光蛋白报告基因的瞬时表达，确定了外源基因能够在所制备的原生质体中成功表达。对比已经报道的单细胞微藻原生质体制备条件，本文不但考察了传统的酶比例，混合酶浓度和 pH 等单因素作用结果，同时通过试验设计综合考察了这三种因素的共同作用，确定了 138 号藻原生质体制备的最优条件。此研究可以为优化单细胞微藻原生质体制备条件提供具有一定通用性的模式，同时还能够推动该海洋单细胞绿藻的生理生化等多方面基础研究，有助于开发其商业应用价值。

参考文献

[1] 宗娜娜. 南海微藻的分离、鉴定及脂肪酸特性分析. 青岛: 青岛科技大学, 2013.

Zong N N. Isolation, identification and fatty acid composition of microalgaes from the south China sea. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology, 2013.

[2] 林玉艳. 一株海洋微藻的分离鉴定及环境因素对其生长的影响. 青岛: 中国海洋大学, 2015.

Lin Y Y. The isolation and identification of a marine microalga and the effect of environmental factors on its growth pattern. Qingdao: Ocean University of China, 2015.

[3] 郭立亮. 海洋微藻 DNA 条形码基因的评估及环境样本多样性分析和定量基因的开发. 青岛: 中国海洋大学, 2015.

Guo L L. Assessment of Marine microalgae DNA barcode genes and development of new gene for the diversity analysis and quantitation of environmental samples. Qingdao: Ocean University of China, 2015.

[4] 李芳芳, 隋正红, 龚春霞, 等. 5 种沙漠微藻的分离鉴定及其 18SrDNA 保守区片段差异分析. 石河子大学学报自然科学版, 2012, 30(3): 265-270.

Li F F, Sui Z H, Gong C X, et al. Isolation and identification of five desert microalgae and analysis of 18S rDNA conserved fragment. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2012, 30(3): 265-270.

[5] Pau L S, Malcolm S Y T, Dillirani N, et al. A holistic approach to managing microalgae for biofuel applications. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(1): 215.

[6] 崔玉林. 亚心型扁藻细胞核与叶绿体稳定转化系统的构建. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2011.

Cui Y L. Establishment of the nuclear and chloroplast transformation system of *Platymonas subcordiformis*. Qingdao: Institute of Oceanology, Chines Academy of Sciences, 2011.

[7] Umemoto Y, Araki T S. Cell wall regeneration in *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta) protoplasts observed using a mannan-specific carbohydrate-binding module. Marine Biotechnology, 2010, 12(1): 24-31.

[8] Millner P A, Callow M E, Evans L V. Preparation of protoplasts from the green alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. Planta, 1979, 147(2): 174-177.

[9] 叶涛, 王明兹, 黄建忠, 等.雨生红球藻原生质体制备与再生育种. 福建师范大学学报自然科学版, 2011, 27(4): 122-126.

Ye T, Wang M Z, Huang J Z, et al. Preparation and regeneration breeding of protoplasts from *Haematococcus pluvialis*. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2011, 27(4): 122-126.

[10] 林学政, 沈继红, 李光友. 复合酶对卡德藻溶壁效果的研究. 海洋科学, 2000, 24(7): 1-4.

Lin X Z, Shen J H, Li G Y. Study on effects of complex enzymes on the cell wall degradation of *Tetraselmis* sp. Marine Sciences, 2000, 24(7): 1-4.

[11] 马晓磊, 张琳, 杨官品, 等. 微拟球藻原生质体制备与再生. 海洋科学, 2012, 36(2): 19-23.

Ma X L, Zhang L, Yang G P, et al. Preparation and regeneration of protoplasts from *Nannochloropsis oculata*. Marine Sciences, 2012, 36(2): 19-23.

[12] 王明兹, 王世锋, 施巧琴, 等. 紫球藻原生质体再生育种. 福建师范大学学报(自然科学科版), 2007, 23(1): 65-69.

Wang M Z, Wang S F, Shi Q Q, et al. Regeneration of protoplasts from porphyridium cruentum and its variation for breeding. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2007, 23(1): 65-69.

[13] Suzuki T, Yamaguchi T, Ishida M. Effects of some factors on protoplast formation of a microalga, *Prototheca zopfii*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997, 13(3): 355-356.

[14] Berliner M D. Protoplast induction in *Chlorella vugaris*. Plant Science Letters, 1977, 9(2): 201-204.

[15] Hatano S, Joh T, Miyamoto T, et al. Preparation of protoplasts from *Chiorella ellipsoidea* C-27. Plant and Cell Physiology, 1992, 33(5): 651-655.

[16] BOX G E P, BEHNKEN D W. Simplex-sum designs: a class of second order rotatable designs derivable from those of first order. The Annals of Mathematical Statistics, 1960, 31(4): 838-864.

[17] RAGONESE R, MACKA M, HUGHES J, et al. The use of the Box-Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 27(6): 995-1007.

[18] 许良, 席海山, 藏洪禹, 等. 荞麦籽壳中芦丁的微波辅助提取工艺的 SPSS 正交设计优化. 计算机与应用化学, 2012, 29(6): 719-722.

Xu L, Xi H S, Zang H Y, et al. Optimization of microwave-extraction technology of flavonoids from shells of tarlary buckwheat by SPSS 17.0. Computers and Applied Chemistry, 2012, 29(6): 719-722.

[19] Norris R E, Hori T, Chihara M. Revision of the genus *Tetraselmis* (Class Prasinophyceae). Journal of Plant Research, 1980, 93(4): 317-339.

作者简介:丁涓,女,实验师，硕士，鲁东大学生命科学学院，山东省烟台市芝罘区红旗中路 186 号鲁东大学生命科学学院 c309，邮编：264000，联系电话：18653509795

通讯作者：蒲洋，男，讲师，博士，鲁东大学农学院，山东省烟台市芝罘区红旗中路 186 号鲁东大学农学院，邮编：264000，联系电话：13884664603